

## **PÉPTIDOS CON CAPACIDAD DE UNIRSE AL FACTOR TRANSFORMANTE DE CRECIMIENTO $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)**

### **CAMPO DE LA INVENCION**

5           La invención se refiere, en general, a péptidos que tienen la capacidad de unirse al factor transformante de crecimiento  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) y a sus aplicaciones. En particular, la invención se refiere a péptidos inhibidores de la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 mediante su unión directa al TGF- $\beta$ 1, y a su empleo en el tratamiento de enfermedades o alteraciones patológicas basadas en una expresión excesiva o  
10           desregulada del TGF- $\beta$ 1.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

          El TGF- $\beta$ 1 es una glicoproteína perteneciente a una superfamilia de proteínas reguladoras (citoquinas) estructuralmente relacionadas entre sí, incluida dentro de una  
15           de las tres isoformas descritas en mamíferos (TGF-beta 1, 2 y 3). La isoforma más abundante es TGF- $\beta$ 1, que consiste en un homodímero de 25 kDa compuesto por 2 subunidades unidas por un puente disulfuro. La secuencia de aminoácidos del TGF- $\beta$ 1 humano ha sido descrita por, por ejemplo, Derynck K et al., "Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and  
20           transformed cells". Nature 316 (6030), 701-705 (1985).

          El TGF- $\beta$ 1 es una molécula cuya secuencia está altamente conservada en términos evolutivos. Aunque originalmente se definió por su capacidad para inducir proliferación independiente de adhesión y cambios morfológicos en fibroblastos de rata, investigaciones posteriores han revelado que el TGF- $\beta$ 1 es un inhibidor general de la  
25           proliferación en un gran número de tipos celulares. Es producido por una gran variedad de tipos celulares y en diferentes tejidos durante todas las fases de la diferenciación celular. Produce una gran variedad de efectos biológicos, genera potentes y muy a menudo opuestos efectos en el desarrollo, fisiología y respuesta inmune. Información sobre el papel del TGF- $\beta$ 1 en la diferenciación y regeneración hepática, y en la fibrosis  
30           hepática, así como los efectos del TGF- $\beta$ 1 sobre la matriz extracelular, puede encontrarse en la solicitud de patente española ES 2146552 A1.

Teniendo como objetivo el estudio de los mecanismos de acción del TGF- $\beta$ 1, se han descrito una decena de proteínas (receptores de membrana y proteínas de matriz extracelular) que interaccionan con esta citoquina.

Por otra parte, debido a que numerosas enfermedades o alteraciones patológicas están asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1, por ejemplo, las fibrosis asociadas con la pérdida de función de un órgano o tejido, o complicaciones quirúrgicas o estéticas, resulta interesante buscar productos capaces de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1, dado que tales productos podrían ser potencialmente utilizados en terapia humana o animal como bloqueantes de las consecuencias patológicas de una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1.

Las estrategias habitualmente utilizadas para inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 incluyen, entre otras, el empleo de (i) anticuerpos específicos neutralizantes, (ii) oligos antisentido del gen codificante del TGF- $\beta$ 1 que bloquean su expresión, o (iii) receptores solubles del TGF- $\beta$ 1 que actúan de forma similar a los anticuerpos. El empleo de anticuerpos permite un bloqueo total y específico de esta citoquina (TGF- $\beta$ 1) aunque se potencian ciertos efectos secundarios tanto por la presencia de inmunoglobulinas exógenas en sangre como por los efectos derivados del bloqueo sistémico del TGF- $\beta$ 1. Además, la estabilidad en el tiempo de las inmunoglobulinas no permite un control a tiempos cortos del bloqueo en la actividad de esta citoquina. Los oligo antisentido inhiben la producción del TGF- $\beta$ 1 a nivel de expresión génica, lo que puede generar desregulaciones importantes en todos los procesos en lo que interviene esta citoquina.

Recientemente se ha desarrollado otra estrategia basada en el empleo de péptidos inhibidores de la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1. En este sentido, la solicitud de patente española ES 2146552 A1 describe unos péptidos sintéticos procedentes tanto del TGF- $\beta$ 1 como de sus receptores, o de proteínas con capacidad de unión al TGF- $\beta$ 1, que pueden ser utilizados como inhibidores de la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se enfrenta, en general, con el problema de buscar nuevos compuestos capaces de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1.

La solución proporcionada por la presente invención se basa en que los inventores han identificado unos péptidos capaces no solo de unirse al TGF- $\beta$ 1 sino, además, capaces de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 mediante su unión directa al propio TGF- $\beta$ 1. Algunos de estos péptidos han sido identificados mediante el empleo de la tecnología asociada con las librerías de fagos que permite determinar péptidos, con un tamaño típicamente comprendido entre 6 y 15 aminoácidos, que presentan una unión de alta afinidad con el TGF- $\beta$ 1, cuantificando, posteriormente, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, la capacidad de inhibición de la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 de los distintos péptidos. Otros péptidos han sido obtenidos mediante truncamiento de péptidos previamente identificados mediante dicha tecnología asociada con las librerías de fagos.

Los péptidos capaces de unirse al TGF- $\beta$ 1, en particular, aquéllos capaces de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 mediante su unión directa al TGF- $\beta$ 1 son potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades y alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1. Asimismo, los péptidos capaces de unirse al TGF- $\beta$ 1 proporcionan una herramienta para el estudio del papel biológico del TGF- $\beta$ 1 (aún por dilucidar en muchos campos de la regulación de distintos procesos biológicos).

Por tanto, un aspecto de esta invención se relaciona con unos péptidos que poseen la capacidad de unirse al TGF- $\beta$ 1. En una realización particular y preferida, dichos péptidos tienen, además, la capacidad de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende, al menos, uno de dichos péptidos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichos péptidos en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1. Ejemplos ilustrativos de dichas enfermedades o alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1 incluyen la fibrosis asociada con la pérdida de función de un órgano o un tejido así como complicaciones quirúrgicas y/o estéticas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con secuencias de ADN que codifican para dichos péptidos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica para un péptido proporcionado por esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende dicha secuencia de ADN o dicha construcción de ADN.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora, tal como una célula hospedadora transformada, que comprende dicha construcción de ADN o dicho vector.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para producir un péptido proporcionado por esta invención que comprende cultivar dichas células hospedadoras bajo condiciones que permiten la expresión de dicho péptido y, si se desea, recuperar el péptido obtenido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas secuencias de ADN y construcciones de ADN en la elaboración de vectores y células para el tratamiento de enfermedades y alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1 mediante terapia génica.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra esquemáticamente la posición de un péptido de 15 aminoácidos (aa), genéticamente fusionado a la proteína pIII, en la superficie del bacteriófago filamentoso M13.

La Figura 2 muestra esquemáticamente la posición génica del inserto, que codifica para un péptido de 15 aa, en el genoma del bacteriófago M13 y la posición del péptido en la secuencia de la proteína pIII.

La Figura 3 muestra esquemáticamente la selección de péptidos mediante la técnica de "Biopanning". El TGF- $\beta$ 1 biotinilado se inmoviliza en placas que contienen estreptavidina (a través de la unión biotina-estreptavidina). La librería de fagos es seleccionada sobre la base de la interacción entre el TGF- $\beta$ 1 y los péptidos presentados por los fagos. Los fagos con baja afinidad por el TGF- $\beta$ 1 son eliminados mediante

lavados. Los fagos retenidos en la placa son eluidos mediante descenso de pH. Tras tres ciclos de enriquecimiento de fagos con alta afinidad por el TGF- $\beta$ 1, los fagos se aíslan y secuencian (véase el Ejemplo 1) [Leyendas de la Figura 3: “a”: Libería de fagos presentando péptidos de 15 aa; “b”: Infección en *E. coli* (K91Kan)(amplificación); “c”: Purificación de los fagos; “d”: Incubación de los fagos con concentraciones decrecientes de TGF- $\beta$ 1; “e”: Lavados; “f”: Elución de los fagos unidos ( $\downarrow$ pH); “g”: Infección en cepa de *E. coli*; “h”: Selección de colonias infectadas (tetracina); “i”: Amplificación de los fagos seleccionados; y “j”: Secuenciación del ADN (correspondiente al péptido) al cabo de tres ciclos de “biopanning”].

10 La Figura 4 es una representación de un árbol de analogías de secuencia entre los péptidos de 15 aminoácidos identificados mediante una librería de fagos.

La Figura 5 es un diagrama que muestra el efecto de la concentración de TGF- $\beta$ 1 sobre el crecimiento de la línea celular Mv-1-Lu, expresada en forma de captación de timidina tritiada en cuentas por minuto (c.p.m.).

15 La Figura 6 es un diagrama ilustrativo del protocolo de inducción de daño hepático agudo (véase el Ejemplo 3).

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención se relaciona con un péptido, en adelante, péptido de la invención, cuya secuencia de aminoácidos comprende entre 3 y 15 restos de aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los péptidos de la invención tienen la capacidad de unirse al TGF- $\beta$ 1. Algunos de dichos péptidos tienen, además, la capacidad de inhibir, *in vitro* y/o *in vivo*, la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1.

30 La capacidad de los péptidos de la invención de unirse al TGF- $\beta$ 1 se puede determinar mediante cualquier método apropiado que permita determinar la unión entre

dos moléculas, por ejemplo, mediante un ensayo de afinidad, que comprende poner en contacto el TGF- $\beta$ 1 con el péptido a ensayar bajo condiciones que permiten la unión de dicho péptido al TGF- $\beta$ 1 y evaluar la unión entre el péptido y el TGF- $\beta$ 1. En una realización particular, dicho ensayo de afinidad puede realizarse utilizando TGF- $\beta$ 1 marcado radiactivamente, por ejemplo,  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 1 humano, tal como se describe en ES 2146552 A1. Alternativamente, el compuesto que puede estar marcado es el péptido a ensayar. En general, este tipo de ensayos de afinidad comprende poner en contacto TGF- $\beta$ 1, por ejemplo, inmovilizado en una placa bloqueada con estreptavidina, con el péptido cuya capacidad de unión al TGF- $\beta$ 1 se desea conocer, y, tras incubar durante un periodo de tiempo apropiado, analizar la unión del péptido al TGF- $\beta$ 1. Los péptidos con baja afinidad por el TGF- $\beta$ 1 son eliminados mediante lavados mientras que los péptidos con mayor afinidad permanecen unidos al TGF- $\beta$ 1 y pueden ser liberados rompiendo las interacciones moleculares entre ambas moléculas, lo que puede realizarse, por ejemplo, bajando el pH. Ensayando el péptido frente a distintas concentraciones de TGF- $\beta$ 1, o viceversa, se puede obtener una idea de la afinidad del péptido en cuestión frente al TGF- $\beta$ 1. La capacidad de los péptidos de la invención de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 *in vitro* se puede evaluar y, si se desea, cuantificar, mediante un ensayo de inhibición del crecimiento de la línea celular Mv-1-Lu, una línea celular derivada de epitelio pulmonar de visón cuya proliferación es inhibida por el TGF- $\beta$ 1 (véase el Ejemplo 2).

La capacidad de los péptidos de la invención de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 *in vivo* se puede evaluar y, si se desea, cuantificar mediante un ensayo en un modelo animal de daño hepático agudo inducido, por ejemplo, por administración de tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) (véase el Ejemplo 3). Como es conocido, el daño hepático agudo genera una cascada de efectos y respuestas fisiológicas que incluye la elevación de los niveles del TGF- $\beta$ 1, responsable, entre otros efectos, de la expresión del gen de colágeno de tipo I, entre otros.

Dentro del alcance de esta invención se encuentran las sales farmacéuticamente aceptables del péptido de la invención. El término "sales farmacéuticamente aceptables" incluye las sales habitualmente utilizadas para formar sales metálicas o sales de adición de ácidos. La naturaleza de la sal no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente

aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables del péptido de la invención pueden obtenerse a partir de ácidos o bases, orgánicos o inorgánicos. Dichas sales pueden obtenerse por métodos convencionales bien conocidos por los técnicos en la materia.

En una realización particular, la invención proporciona un péptido que  
5 comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 restos de aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, y sus sales  
10 farmacéuticamente aceptables.

En una realización concreta, la invención proporciona un péptido seleccionado del grupo formado por los péptidos identificados por la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID  
15 NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otra realización concreta, la invención proporciona un péptido seleccionado  
20 del grupo formado por los péptidos identificados por la SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36, y sus sales farmacéuticamente aceptables. Estos péptidos comprenden entre 9 y 14 restos de aminoácidos consecutivos de la secuencia de  
25 aminoácidos del péptido identificado por la SEQ ID NO: 17 y han sido obtenidos por truncamiento de dicho péptido (Ejemplo 4).

En otra realización concreta, la invención proporciona un péptido seleccionado del grupo formado por los péptidos identificados por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17,  
30 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34 y sus sales farmacéuticamente aceptables. Los péptidos identificados por la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 17, presentan actividad inhibidora de la

actividad biológica de TGF- $\beta$ 1, tanto *in vitro* como *in vivo*; el péptido identificado por la SEQ ID NO: 2 presenta únicamente actividad inhibidora de la actividad biológica de TGF- $\beta$ 1 *in vivo*; y los péptidos identificados por la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 18, presentan únicamente actividad inhibidora de la actividad biológica de TGF- $\beta$ 1 *in vitro*.

5 Los péptidos identificados por la SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34 presentan actividad inhibidora de la actividad biológica de TGF- $\beta$ 1 *in vitro*.

Para la identificación inicial de péptidos con capacidad de unirse al TGF- $\beta$ 1 se ha utilizado la tecnología asociada con las librerías de fagos que permite determinar péptidos que presentan una unión de alta afinidad con el TGF- $\beta$ 1, y cuantificar,

10 posteriormente, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, la capacidad de inhibición de la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 de los distintos péptidos. La secuencia de los péptidos que se unen al TGF- $\beta$ 1, inhibiendo *in vitro* o *in vivo* la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1, se puede deducir a partir de la secuencia del ADN correspondiente al cabo de varios ciclos de "biopanning", generalmente 3. El empleo de librerías de fagos para identificar

15 inhibidores de ciertos productos ha sido descrita, por ejemplo, por Chirinos-Rojas C.L. et al., en *Immunology*, 1999, Jan. 96(1):109-113; McConnell S.J., et al., en *Gene* 1994, Dec. 30, 151(1-2):115-118; o Smith G.P., *Science*, 1985, Jun. 14, 228(4705):1315-1317.

Por tanto, la invención proporciona un método para la identificación de péptidos

20 que tienen la capacidad de unirse al TGF- $\beta$ 1 que comprende:

- (i) utilizar una librería de fagos que comprende una pluralidad de fagos filamentosos, conteniendo el genoma de cada uno de dichos fagos una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido diferente ligada al gen de una proteína de la cubierta del fago, con lo que cada

25 fago contiene un péptido diferente genéticamente fusionado a una proteína de la cubierta del fago;
- (ii) seleccionar, mediante un ensayo de afinidad, los fagos que contienen los péptidos que se unen con mayor afinidad al TGF- $\beta$ 1; y
- (iii) determinar la secuencia de los péptidos que se unen al TGF- $\beta$ 1, a

30 partir de las secuencias de ADN correspondientes insertadas en los



fagos seleccionados en la etapa (ii) y que codifican para dichos péptidos que se unen al TGF- $\beta$ 1.

En una realización particular, con el fin de obtener péptidos de 15 aminoácidos capaces de unirse con alta afinidad al TGF- $\beta$ 1 y con posible actividad inhibitoria de la actividad biológica de dicha citoquina, se utilizó una librería de fagos compuesta por una pluralidad de bacteriófagos filamentosos (M13) conteniendo cada uno de ellos un péptido diferente, de 15 aminoácidos, genéticamente fusionado a una proteína de la cubierta del fago, en este caso unido al extremo N-terminal de la proteína de cubierta pIII. De esta forma, el fago presenta sobre su superficie un péptido de 15 aminoácidos, en cada una de las cinco moléculas de la proteína de superficie, mientras en su interior contiene el ADN que codifica para dicha secuencia peptídica. En las librerías de fagos la secuencia codificante para el péptido proviene de una secuencia degenerada en cada una de las 15 posiciones con los 20 aminoácidos naturales, lo que permite la presentación de  $1,1 \times 10^{12}$  secuencias posibles de 15 aminoácidos en diferentes fagos. La relación física, 1 a 1, entre la secuencia peptídica y el ADN que lo codifica en el bacteriófago permite seleccionar, de entre un gran número de variantes, aquellas secuencias que se unen específicamente al TGF- $\beta$ 1. Este proceso se realiza mediante un ensayo de afinidad.

En una realización particular, dicho ensayo de afinidad consiste en un protocolo de selección *in vitro* denominado "biopanning". Brevemente, dicha técnica consiste en la incubación de un conjunto de fagos representantes, a efectos prácticos, de todas las variantes de péptidos de 15 aminoácidos (en este caso), en una placa bloqueada con estreptavidina a la que se le añade TGF- $\beta$ 1 biotinilado. El TGF- $\beta$ 1 biotinilado queda anclado a la placa a través de la interacción biotina-estreptavidina, con lo que queda correctamente presentado para su interacción con los péptidos portados por los fagos. Tras una incubación se eliminan los fagos no unidos mediante lavados y posteriormente se eluyen los fagos unidos específicamente, mediante un descenso de pH que rompe las interacciones moleculares entre el TGF- $\beta$ 1 y los péptidos presentados por los fagos. Los fagos eluidos son, entonces, amplificados mediante infección en una cepa bacteriana. El proceso se repite un total de 3 rondas, de manera que el contenido de fagos que se unen específicamente y con alta afinidad al TGF- $\beta$ 1 se va enriqueciendo. La concentración de

TGF- $\beta$ 1 biotinilado utilizado para bloquear las placas se va reduciendo progresivamente en cada ronda, por ejemplo, de 2,5 a 0,01 y finalmente 0,001  $\mu$ g/ml. De este modo, los fagos seleccionados en cada ronda presentan cada vez mayor grado de afinidad por el TGF- $\beta$ 1. Al final del proceso los fagos que han sido seleccionados por su afinidad con el TGF- $\beta$ 1 son secuenciados con cebadores. Esto permite obtener las secuencias de los péptidos presentados en los fagos.

El Ejemplo 1 ilustra la selección de péptidos que se unen al TGF- $\beta$ 1 mediante librería de fagos, selección por “biopanning” y secuenciación de los péptidos con unión de alta afinidad al TGF- $\beta$ 1.

La invención también proporciona un método para la identificación de péptidos que tienen la capacidad de unirse al TGF- $\beta$ 1 que comprende truncar péptidos que poseen la capacidad de unirse al TGF- $\beta$ 1 y ensayar la capacidad de dichos péptidos truncados para unirse al TGF- $\beta$ 1. Los péptidos truncados pueden obtenerse por cualquier método convencional, por ejemplo, por síntesis química (dado su tamaño) de las versiones truncadas del péptido por su extremo N-terminal, C-terminal o por ambos extremos. La capacidad de dichos péptidos truncados para unirse al TGF- $\beta$ 1 puede determinarse mediante cualquier método apropiado que permita determinar la unión entre dos moléculas, por ejemplo, mediante un ensayo de afinidad, que comprende poner en contacto el TGF- $\beta$ 1 con el péptido a ensayar bajo condiciones que permiten la unión de dicho péptido al TGF- $\beta$ 1 y evaluar la unión entre el péptido y el TGF- $\beta$ 1, tal como se ha mencionado previamente. Asimismo, la capacidad de dichos péptidos truncados de inhibir, *in vitro* y/o *in vivo*, la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 puede ensayarse por cualquiera de los ensayos mencionados en esta descripción.

Debido al papel que desempeña el TGF- $\beta$ 1 en numerosos procesos biológicos, una consecuencia de la actividad inhibidora del TGF- $\beta$ 1 de los péptidos de la invención tiene que ver con el desarrollo potencial de una nueva familia de fármacos útiles para el tratamiento de enfermedades y alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1, ya que tales péptidos permiten bloquear el exceso o desregulación de dicha citoquina que origina daño.

Los péptidos de la invención, por tanto, pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades o alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o

desregulada del TGF- $\beta$ 1, tales como (i) la fibrosis asociada con la pérdida de función de un órgano o un tejido, por ejemplo, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática (cirrosis), fibrosis renal, fibrosis corneal, etc., así como (ii) las complicaciones quirúrgicas y/o estéticas, por ejemplo, fibrosis asociada con la cirugía cutánea y peritoneal, fibrosis asociada con quemaduras, fibrosis osteo-articular, queloides, etc.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede contener uno o más péptidos de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más, compuestos inhibidores del TGF- $\beta$ 1 alternativos. Dicha composición farmacéutica es útil para su administración y/o aplicación en el cuerpo humano o animal, preferentemente en el cuerpo humano.

El empleo de péptidos, tales como los péptidos de la invención, en lugar de utilizar anticuerpos u oligos antisentido, presenta numerosas ventajas, ya que son moléculas pequeñas, con mayor capacidad de difusión y de vida media más corta. Los péptidos pueden llegar a tener una elevada afinidad por el TGF- $\beta$ 1, pero se degradan más rápidamente que los anticuerpos pudiéndose controlar mediante dosificación los efectos secundarios adversos. También es más accesible la vehiculización de los péptidos a órganos o tejidos diana en comparación con otro tipo de compuestos.

Los péptidos de la invención pueden administrarse para tratar las enfermedades y las alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1 por cualquier medio que produzca el contacto del péptido de la invención con el sitio de acción del mismo en el cuerpo humano o animal. La cantidad de péptido, derivado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo que puede estar presente en la composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede variar dentro de un amplio intervalo.

La dosificación para tratar una enfermedad o alteración patológica asociada con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1 con los péptidos y/o composiciones farmacéuticas de la invención dependerá de numerosos factores, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la enfermedad o alteración patológica, la ruta y frecuencia de administración y del péptido de la invención a administrar.

Las composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos de la invención pueden presentarse en cualquier forma de administración, por ejemplo, sólida o líquida, y pueden administrarse por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, rectal o tópica, para lo cual incluirán los excipientes farmacéuticamente  
5 aceptables necesarios para la formulación de la forma de administración deseada, por ejemplo, pomadas (lipogeles, hidrogeles, etc.), colirios, aerosoles por nebulización, soluciones inyectables, bombas osmóticas, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia  
10 Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

El empleo de los péptidos de la invención en la elaboración de dicha composición farmacéutica constituye un aspecto adicional de esta invención. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un péptido de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o alteraciones  
15 patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada de TGF- $\beta$ 1, tales como la fibrosis asociada con la pérdida de función de un órgano o un tejido, por ejemplo, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática (cirrosis), fibrosis renal, fibrosis corneal, etc.; o las complicaciones quirúrgicas y/o estéticas, por ejemplo, fibrosis asociada con la cirugía cutánea y peritoneal, fibrosis asociada con quemaduras, fibrosis osteo-articular,  
20 queloides, etc.

Los péptidos de la invención pueden obtenerse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante técnicas de síntesis química sobre fase sólida; purificarse mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); y, si se desea, se pueden analizar mediante técnicas convencionales, por ejemplo, mediante secuenciación y  
25 espectrometría de masas, análisis de aminoácidos, resonancia magnética nuclear, etc.

Alternativamente, los péptidos de la invención pueden obtenerse mediante la tecnología del ADN recombinante. Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una secuencia de ADN que codifica para un péptido de la invención. Dicha secuencia de ADN puede ser deducida fácilmente a partir de la secuencia del péptido.

30 Dicha secuencia de ADN puede estar contenida en una construcción de ADN. Por tanto, la invención proporciona una construcción de ADN que comprende una

secuencia de ADN que codifica para un péptido de la invención. Dicha construcción de ADN puede incorporar, operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión de la secuencia de ADN que codifica para el péptido de la invención. Las secuencias de control son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción del péptido de la invención, e incluyen secuencias promotoras, terminadoras, etc., funcionales en células hospedadoras transformadas que comprenden dicha secuencia o construcción de ADN. En una realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en bacterias. Ventajosamente, dicha construcción de ADN comprende, además, un marcador o gen que codifica para un motivo o para un fenotipo que permita la selección de la célula hospedadora transformada con dicha construcción de ADN. La construcción de ADN proporcionada por esta invención puede obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica [Sambrook et al., "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3].

La secuencia de ADN o la construcción de ADN proporcionadas por esta invención, pueden ser insertadas en un vector apropiado. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, tal como un vector de expresión, que comprende dicha secuencia o construcción de ADN. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra o no en el genoma de dicha célula. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook et al., 1989, citado *supra*].

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora, tal como una célula hospedadora transformada, que comprende una secuencia de ADN o una construcción de ADN proporcionadas por esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para producir un péptido de la invención que comprende crecer una célula hospedadora que comprende la secuencia o construcción de ADN proporcionada por esta invención bajo condiciones que permiten la producción de dicho péptido de la invención y, si se desea, recuperar dicho péptido de la invención. Las condiciones para optimizar el cultivo de

dicha célula hospedadora dependerán de la célula hospedadora utilizada. Si se desea, el procedimiento para producir el péptido de la invención incluye, además, el aislamiento y purificación de dicho péptido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas secuencias de ADN y construcciones de ADN en la elaboración de vectores y células para el tratamiento de enfermedades y alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1 mediante terapia génica. De acuerdo con este aspecto de la invención, dichas secuencia o construcción de ADN se ponen en contacto con un vector de transferencia génica, tal como un vector viral o no viral. Vectores virales apropiados para poner en práctica esta realización de la invención incluyen, pero no están limitados a los siguientes, vectores adenovirales, vectores adenoasociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores alfavirales, vectores herpesvirales, vectores derivados de coronavirus, etc. Vectores de tipo no viral apropiados para poner en práctica esta realización de la invención incluyen, pero no están limitados a los siguientes: ADN desnudo, liposomas, poliaminas, dendrímeros, glicopolímeros catiónicos, complejos liposoma-policación, proteínas, sistemas de transferencia génica mediados por receptor, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

## EJEMPLO 1

### Selección de péptidos que se unen al TGF- $\beta$ 1 mediante librería de fagos

Para la obtención de secuencias de 15 aminoácidos capaces de unirse con alta afinidad al TGF- $\beta$ 1 y con posible actividad inhibitoria de la actividad biológica de esta citoquina, se utilizó una técnica de selección *in vitro* basada en la tecnología desarrollada a partir de las librerías de fagos. Estas librerías constan de bacteriófagos filamentosos (M13) que contienen un péptido genéticamente fusionado a una proteína de la cubierta del virus, en este caso unido al extremo N-terminal de la proteína de cubierta pIII (Figura 1). De esta forma el fago presenta sobre su superficie un péptido de 15 aminoácidos, en cada una de las 5 moléculas de esta proteína que presenta el fago en su superficie, mientras en su interior contiene el ADN que codifica para dicha secuencia peptídica. En las librerías de fagos la secuencia codificante para el péptido proviene de una secuencia degenerada en cada una de las 15 posiciones con los 20 aminoácidos naturales. Esto permite la presentación de  $1,1 \times 10^{12}$  secuencias posibles de 15 aminoácidos en diferentes fagos. La relación física, 1 a 1, entre la secuencia peptídica y el ADN que lo codifica en el bacteriófago permite seleccionar, de entre un gran número de variantes, aquellas secuencias que se unen específicamente al TGF- $\beta$ 1. Este proceso se realiza mediante un protocolo de selección *in vitro* denominado "biopanning".

La librería de fagos utilizada para la realización de este ejemplo procede de una segunda amplificación de la librería primaria descrita por T. Nishi, H. Tsuru y H. Saya [Exp. Med. (Japan) 11, 1759 (1993)], cedida por el laboratorio de George P. Smith. Información adicional sobre esta tecnología puede encontrarse en la siguiente página web:

<http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html>

### Técnica de selección (Biopanning)

Esta técnica consiste en la incubación de un conjunto de fagos, representantes (a efectos prácticos) de todas las variantes de 15 aminoácidos, en una placa bloqueada con estreptavidina (10  $\mu$ g/ml en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, 2h a temperatura ambiente) a la que se le añade TGF- $\beta$ 1 biotinilado. El TGF- $\beta$ 1 biotinilado queda anclado a la placa a través de

la interacción biotina-estreptavidina, con lo que queda correctamente presentado para su interacción con los péptidos portados por los fagos. El TGF- $\beta$ 1 se pone en contacto con los péptidos portado por los fagos a una concentración de  $3 \times 10^4$  virus/ml y se deja incubar durante 12 horas aproximadamente. Tras la incubación, se eliminan los fagos no unidos mediante 5 lavados con PBS/Tween (tampón fosfato salino/polioxialquilen derivados de ésteres de ácidos grasos de sorbitano) y posteriormente se eluyen los fagos unidos específicamente, mediante un descenso de pH (buffer de elución) que rompe las interacciones moleculares entre el TGF- $\beta$ 1 y los péptidos presentados por los fagos. Los fagos eluidos son, entonces, amplificados mediante infección en una cepa bacteriana (*E. coli*). El proceso se repite un total de 3 rondas, de manera que el contenido de fagos que se unen específicamente y con alta afinidad al TGF- $\beta$ 1 se va enriqueciendo (Figura 3). La concentración de TGF- $\beta$ 1 biotinilado utilizado para bloquear las placas se va reduciendo progresivamente en cada ronda de 2,5 a 0,01 y finalmente 0,001  $\mu$ g/ml. De este modo, los fagos seleccionados en cada ronda presentan cada vez mayor grado de afinidad por el TGF- $\beta$ 1. Al final del proceso los fagos que han sido seleccionados por su afinidad con el TGF- $\beta$ 1, son secuenciados con cebadores, tras ser aislados mediante resistencia a tetraciclina que confieren los fagos modificados genéticamente tras infectar células de *E. coli*. Esto permite obtener las secuencias de los péptidos presentados en los fagos de un número de clones obtenido de colonias aisladas. El número de veces que se repite una secuencia, correspondiente a un péptido de 15 aminoácidos portado por cada clon, del total de clones secuenciados da una idea del grado de afinidad relativa que tiene dicha secuencia de 15 aminoácidos por el TGF- $\beta$ 1.

#### Secuencia de los péptidos

Para la obtención de clones de los fagos, obtenidos a partir del "biopanning", se realiza una selección en presencia de un antibiótico de colonias bacterianas infectadas por estos fagos, cuya resistencia viene dada por un gen de resistencia a tetraciclina presente en el genoma de los fagos. Con este método únicamente crecen colonias infectadas por bacteriófagos. Así cada colonia contiene el genoma de un único fago al que le corresponde la secuencia de un solo péptido presentado en su superficie.



De las 108 colonias de bacterias infectadas por fagos, derivados de la última ronda de selección por "biopanning, se secuenció la porción del genoma que engloba la región correspondiente a los péptidos presentados en la proteína pIII utilizando el cebador identificado mediante la SEQ ID NO: 23. De este modo se obtuvieron las secuencias que se muestran en la Tabla 1 donde se indican además el número de colonias (clones) que portaban dichas secuencias.

**Tabla 1**  
**Secuencias de aminoácidos procedentes de los fagos que interactúan con el TGF- $\beta$ 1**

SEQ ID NO:	Nº de colonias
1	6
2	1
3	41
4	18
5	1
6	12
7	2
8	2
9	1
10	1
11	4
12	1
13	6
14	2
15	1
16	1
17	3
18	1
19	1
20	1
21	1
22	1

El número de clones (colonias) de cada secuencia da una idea relativa del grado de afinidad entre los péptidos y el TGF- $\beta$ 1, o sea, a mayor número de clones mayor afinidad de unión. Sin embargo, el grado de afinidad no se corresponde con la capacidad de bloquear la actividad del TGF- $\beta$ 1 puesto que el péptido más activo, el

péptido identificado con la SEQ ID NO: 17 (véanse las Tablas 2 y 3) da 3 clones, mientras que el péptido identificado con la SEQ ID NO: 3, que da 41 clones, es mucho menos activo en el ensayo de daño hepático agudo (Tabla 3). Aunque no se desea estar vinculado a ninguna teoría, esta cuestión podría ser explicada sobre la base de que el péptido más activo bloquearía probablemente la unión del TGF- $\beta$ 1 a su receptor.

#### Comparación de las secuencias peptídicas

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa CLUSTAL W (1.81). Este programa genera un agrupamiento múltiple de secuencias en función de sus analogías de secuencia aminoacídica. Los péptidos quedan así agrupados por familias estructurales (Figura 4). En base a las analogías que presentan estos péptidos se pueden sugerir motivos menores de unión al TGF- $\beta$ 1 o grupos de péptidos que se unen a diferentes regiones del TGF- $\beta$ 1.

#### **EJEMPLO 2**

##### **Inhibición de la actividad biológica *in vitro* del TGF- $\beta$ 1 mediante péptidos en ensayos de proliferación con células Mv-1-Lu**

La línea celular Mv-1-Lu (CCL-64, American Type Cell Culture, Virginia, Estados Unidos) deriva de epitelio pulmonar de visón, crece en monocapa y responde al TGF- $\beta$ 1 exógeno con una disminución de su proliferación (Figura 5). La inhibición mediante péptidos de esta citoquina es capaz de restablecer su crecimiento y refleja la capacidad de los distintos péptidos como inhibidores de la actividad biológica *in vitro* del TGF- $\beta$ 1. Los péptidos ensayados fueron obtenidos mediante síntesis peptídica siguiendo procedimientos convencionales (Merrifield RB. J Am Chem Soc 1963; 85:2149-2154; Atherton E et al. J Chem Soc Perkin Trans 1981; 1:538-546).

Las células Mv-1-Lu se cultivan hasta la subconfluencia en medio completo [RPMI-1640 suplementado con L-glutamina, piruvato sódico, antibióticos y 10% de suero de ternera fetal (FBS)] a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en botellas de 162 cm<sup>2</sup> (Costar Corporation, CA, USA). Las células, tras tripsinizado, se cultivan en 200  $\mu$ l de medio completo en placas de 96 pocillos a una densidad inicial de 5.000 células/pocillo, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, durante 6 horas para permitir su adhesión. Posteriormente se añaden los

tratamientos de los diferentes péptidos a distintas concentraciones, comenzando con 200 µg/ml y se añade TGF-β1 (Human Transforming Growth Factor-β1, Roche) a una concentración de 200 pg/ml. Tras 12 horas de incubación se añade 1 µCi de metil-<sup>3</sup>H-timidina (Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido) por pocillo en 25 µl de medio limpio (RPMI-1640) y se incuba la placa 12 horas más en las mismas condiciones. Finalmente, se cosechan las células (Filtermate 196 Harvester, Packard) transfiriéndose la timidina tritiada, incorporada en la síntesis de ADN, a placas (UniFilter-96 GF/C®, Perkin Elmer) y la radiactividad se cuantifica, tras adición de líquido de centelleo, en un contador de centelleo (Top Count, Microplate Scintillation Counter, Packard). Como control positivo y negativo se utilizó la incorporación de timidina tritiada en ausencia y presencia de TGF-β1, respectivamente. La inhibición de la actividad del TGF-β1 en este ensayo se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{100 \times (\text{cpm con péptido} - \text{cpm control negativo})}{(\text{cpm control positivo} - \text{cpm control negativo})}$$

El control negativo representa la incorporación de timidina tritiada en presencia de TGF-β1, pero en ausencia de péptido, mientras que el control positivo se refiere al mismo parámetro en ausencia de TGF-β1 y péptido. Así se puede medir el porcentaje de inhibición de los péptidos sobre la actividad biológica del TGF-β1, por su capacidad de revertir el efecto represor de esta citoquina sobre la proliferación de la línea celular Mv-1-Lu (Tabla 2).

Tabla 2

**Efecto de los péptidos obtenidos mediante la selección por “biopanning” sobre la inhibición de la actividad biológica *in vitro* del TGF- $\beta$ 1, calculado a partir del restablecimiento del crecimiento de la línea Mv-1-Lu**

SEQ ID NO:	% Inhibición
1	3,33 $\pm$ 4,3
2	-0,96 $\pm$ 0,83
3	25,39 $\pm$ 1,7
4	5,53 $\pm$ 7,2
5	15,78 $\pm$ 7,7
6	12,85 $\pm$ 4,5
7	-24,96 $\pm$ 0,75
8	15,67 $\pm$ 8,5
9	4,98 $\pm$ 9,5
10	-4,58 $\pm$ 0,9
11	27,36 $\pm$ 0,9
12	10,70 $\pm$ 0,9
13	17,97 $\pm$ 4,3
14	3,62 $\pm$ 5,6
15	13,45 $\pm$ 9,5
16	9,47 $\pm$ 4,2
17	38,92 $\pm$ 2,3
18	21,29 $\pm$ 2,8
19	9,71 $\pm$ 3,2
20	6,16 $\pm$ 9,5
21	13,40 $\pm$ 3,2
22	4,13 $\pm$ 1,4
P144	7,26 $\pm$ 3,53

5

Los péptidos identificados como SEQ ID NO: 3, 11, 17 y 18 inhiben la actividad biológica *in vitro* del TGF- $\beta$ 1 con un porcentaje de inhibición superior al 20%.

Adicionalmente, se ha comparado la actividad del péptido identificado como P144 en la solicitud de patente española ES 2146552 A1 con la actividad del péptido identificado mediante la SEQ ID NO: 17 en cuanto a su capacidad para revertir el efecto represor del TGF- $\beta$ 1 sobre la proliferación de la línea celular Mv-1-Lu previamente descrito, observándose una mejor actividad del péptido identificado como SEQ ID NO: 17.

10

**EJEMPLO 3****Inhibición de la actividad biológica *in vivo* del TGF- $\beta$ 1 mediante péptidos en un modelo de daño hepático agudo, inducido por CCl<sub>4</sub>**

El daño hepático agudo genera una cascada de efectos y respuestas fisiológicas que incluye la elevación de los niveles de TGF- $\beta$ 1. Esta elevación es la responsable de inducir la expresión, entre otros, del gen de colágeno de tipo I. En este modelo de daño hepático agudo en ratones hembras Balb/C de 25 a 30 g de peso, se administran por vía oral 2  $\mu$ l de CCl<sub>4</sub> por gramo de ratón en relación volumétrica de 1:1 con aceite de maíz. El grupo control recibe un volumen equivalente de aceite de maíz, y los grupos tratados reciben, tras la dosis inicial de CCl<sub>4</sub>, 50  $\mu$ g de péptido en 500  $\mu$ l de suero fisiológico al 1% en DMSO (dimetilsulfóxido) cada 24 h. Tras 72 horas todos los animales son sacrificados y se realiza el procesamiento de las muestras hepáticas; para evaluar la expresión de ARNm se congeló tejido hepático en nitrógeno líquido almacenándose seguidamente a -80°C hasta su utilización. Otras muestras de tejido hepático fueron conservadas en OCT® o Tissue-Tek® (Sakura Finetek B.V.) procesándose de la misma manera que las muestras destinadas a extracción de ARNm, y también se conservaron muestras en formol tamponado al 10%, para su posterior inclusión en parafina y evaluación histológica. Posteriormente se cuantifica el nivel de ARNm de colágeno tipo I de todos los grupos mediante PCR cuantitativa. En la Figura 6 se muestra un diagrama de flujo correspondiente a la inducción, toma de muestras y cuantificación de los resultados en el ensayo de daño hepático agudo. La capacidad de los péptidos estudiados de bloquear el daño agudo, medido según los niveles de ARNm de colágeno de tipo I inducido se determinó cuantificando este ARN por PCR en tiempo real. En la Tabla 3 se muestra el grado de inhibición de la expresión de colágeno correspondiente a cada uno de los péptidos. Los péptidos ensayados fueron obtenidos mediante síntesis peptídica siguiendo procedimientos convencionales (Merrifield RB. J Am Chem Soc 1963; 85:2149-2154; Atherton E et al. J Chem Soc Perkin Trans 1981; 1:538-546).

Tabla 3

**Efecto de los péptidos obtenidos mediante la selección por “biopanning” sobre la inhibición de la actividad biológica *in vivo* del TGF- $\beta$ 1, calculado sobre la inhibición de la inducción de ARNm de colágeno tipo I en un modelo de daño hepático agudo**

5

SEQ ID NO:	% Inhibición
1	0,69
2	36,6 $\pm$ 30,7
3	2,09
4	51,30 $\pm$ 15,3
5	Neg
6	74,94 $\pm$ 25,3
7	Neg
8	Neg
9	26,59
10	Neg
11	39,34 $\pm$ 21,9
12	Neg
13	32,70
14	49,84 $\pm$ 24
15	14,26
16	Neg
17	93,09 $\pm$ 9,6
18	Neg
19	12,12
20	1,41
21	Neg
22	Neg
P144	-3,51 $\pm$ 36

(Neg: negativo)

Los péptidos identificados como SEQ ID NO: 2, 4, 6, 11, 14 y 17 inhiben la actividad biológica *in vivo* del TGF- $\beta$ 1 con un porcentaje de inhibición superior al 35%.

10

Adicionalmente, se ha comparado la actividad del péptido identificado como P144 en la solicitud de patente española ES 2146552 A1 con la del péptido identificado mediante SEQ ID NO: 17 en cuanto a su capacidad para inhibir la expresión del ARNm del colágeno de tipo I en el ensayo de daño agudo hepático en ratones previamente definido. En este ensayo comparativo, se observa que el péptido identificado como SEQ ID NO: 17 inhibe la expresión del ARNm del colágeno de tipo I mucho más que el

15

péptido identificado como P144 en la solicitud de patente española ES 2146552 A1 que no tiene actividad. Los resultados obtenidos con los ensayos comparativos (Ejemplos 2 y 3) ponen de manifiesto que un péptido ilustrativo de los péptidos de esta invención (el péptido identificado mediante la SEQ ID NO: 17) es más activo que un péptido ilustrativo de la solicitud de patente española ES 2146552 A1 (el péptido identificado como P144) en los ensayos de proliferación con células Mv-1-Lu y en un modelo de daño hepático agudo.

#### EJEMPLO 4

**Inhibición de la actividad biológica *in vitro* del TGF- $\beta$ 1 mediante péptidos truncados de la secuencia del péptido SEQ ID NO: 17, en ensayos de proliferación con células Mv-1-Lu**

En este ejemplo se muestra la actividad inhibidora de algunos péptidos cuya secuencia de aminoácidos comprende entre 3 y 15 restos de aminoácidos consecutivos de una de las secuencias de aminoácidos de la invención.

Se ha comparado la actividad de péptidos truncados (derivados de la secuencia del péptido SEQ ID NO: 17) respecto a la secuencia completa, en cuanto a su capacidad para revertir el efecto represor del TGF- $\beta$ 1, sobre la proliferación de la línea celular Mv-1-Lu. Para ello, y con la intención de identificar la secuencia mínima del péptido SEQ ID NO: 17 capaz de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 *in vitro*, se sintetizaron versiones truncadas de este péptido, por el extremo N- terminal, C- terminal o por ambos extremos. Los péptidos ensayados fueron obtenidos mediante síntesis peptídica siguiendo procedimientos convencionales (Merrifield RB. J Am Chem Soc 1963; 85:2149-2154; Atherton E et al. J Chem Soc Perkin Trans 1981; 1:538-546). Siguiendo la misma metodología descrita en el Ejemplo 2, se cuantificó la actividad de los péptidos truncados en el ensayo de proliferación con células Mv-1-Lu, en comparación con la actividad de la secuencia completa de péptido SEQ ID NO: 17.

Tabla 4

**Efecto de los péptidos truncados obtenidos de la secuencia del péptido SEQ ID NO: 17 sobre la inhibición de la actividad biológica *in vitro* del TGF- $\beta$ 1, calculado a partir del restablecimiento del crecimiento de la línea Mv-1-Lu**

SEQ ID NO:	Secuencia	% Inhibición
17	KRIWFIPRSSWYERA	28,5 $\pm$ 3,9
24 (T1)	RIWFIPRSSWYERA	9,4 $\pm$ 0,4
25 (T2)	RIWFIPRSSWYER	6,2 $\pm$ 1,5
26 (T3)	IWFIPRSSWYERA	4,5 $\pm$ 1,8
27 (T4)	IWFIPRSSWYE	1,4 $\pm$ 2,5
28 (T5)	WFIPRSSWY	3,1 $\pm$ 0,9
29 (T6)	WFIPRSSWYERA	2,7 $\pm$ 1,8
30 (T7)	FIPRSSWYERA	-0,3 $\pm$ 3,0
31 (T8)	IPRSSWYERA	3,4 $\pm$ 1,4
32 (T9)	PRSSWYERA	3,8 $\pm$ 1,6
33 (T10)	KRIWFIPRSSWYER	31,4 $\pm$ 7,0
34 (T11)	KRIWFIPRSSWY	34,4 $\pm$ 7,9
35 (T12)	KRIWFIPRSS	6,0 $\pm$ 0,4
36 (T13)	KRIWFIPRS	6,2 $\pm$ 2,5

5

Como se muestra en la Tabla 4, en este ensayo comparativo, la eliminación de la lisina (K) del extremo N-terminal, conlleva una pérdida de actividad del péptido SEQ ID NO: 17, del 28,5% al 9,4%. Por el contrario, la eliminación de hasta 3 aminoácidos del extremo C-terminal no afecta a la actividad del péptido. Por otro lado, la eliminación de los aminoácidos aromáticos, tirosina (Y) y triptófano (W), elimina la actividad del péptido. Esto permite reducir la secuencia original del péptido SEQ ID NO: 17 a una secuencia de 12 aminoácidos (KRIWFIPRSSWY) [SEQ ID NO: 34] sin afectar a su actividad inhibitoria del TGF- $\beta$ 1 *in vitro*.

10



**REIVINDICACIONES**

5           1. Un péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende entre 3 y 15 restos de aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, 10 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

          2. Péptido según la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 restos de aminoácidos consecutivos de una 15 secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, y sus sales 20 farmacéuticamente aceptables.

          3. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que posee, además, la capacidad de unirse al factor transformante del crecimiento  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ).

4. Péptido según la reivindicación 3, seleccionado del grupo formado por los péptidos identificados por la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

10

5. Péptido según la reivindicación 3, que posee, además, la capacidad de inhibir, *in vitro* y/o *in vivo*, la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1.

6. Péptido según la reivindicación 5, seleccionado del grupo formado por los péptidos identificados por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

7. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, que comprende, al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, junto con, opcionalmente, uno o más, compuestos inhibidores del TGF- $\beta$ 1 diferentes.

9. Empleo de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada de TGF- $\beta$ 1 .

30

10. Empleo según la reivindicación 9, en el que dichas enfermedades o alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada de TGF- $\beta$ 1 comprenden la fibrosis asociada con la pérdida de función de un órgano o un tejido, y las complicaciones quirúrgicas y/o estéticas.

5

11. Empleo según la reivindicación 10, en el que dichas enfermedades o alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada de TGF- $\beta$ 1 comprenden fibrosis pulmonar, fibrosis hepática (cirrosis), fibrosis renal, fibrosis corneal, fibrosis asociada con la cirugía cutánea y peritoneal, fibrosis asociada con quemaduras, fibrosis osteo-articular o queloides.

10

12. Una secuencia de ADN que codifica para un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

15

13. Una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN según la reivindicación 12.

14. Construcción de ADN según la reivindicación 13 que comprende, además, operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión de dicha secuencia de ADN.

20

15. Un vector que comprende una secuencia de ADN según la reivindicación 12, o una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14.

25

16. Una célula hospedadora que comprende una secuencia de ADN según la reivindicación 12, o una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, o un vector según la reivindicación 15.

17. Un procedimiento para producir un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende crecer una célula hospedadora según la reivindicación 16 bajo condiciones que permiten la producción de dicho péptido, y, si se desea, recuperar dicho péptido.

5

18. Empleo de una secuencia de ADN según la reivindicación 12, o de una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en la elaboración de vectores y células para el tratamiento de enfermedades y alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1 mediante

10

terapia génica.

## REIVINDICACIONES MODIFICADAS

[recibidas por la Oficina Internacional el 22 de diciembre de 2004 (22.12.04);  
reivindicaciones 1-18 reemplazadas por las reivindicaciones 1-17 modificadas]

MODIFICADO SEGÚN EL ARTÍCULO 19: REIVINDICACIONES

1. Un péptido caracterizado porque posee capacidad de  
5 unirse a TGF- $\beta$ 1, cuya secuencia de aminoácidos está  
seleccionada entre una cualquiera de las SEQ ID NO: 1  
- SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 9 - SEQ ID NO: 22 y SEQ ID  
NO: 24 - SEQ ID NO: 36, o fragmentos de los mismos de  
entre 3 y 15 aminoácidos, y sus sales  
10 farmacéuticamente aceptables.
2. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado  
porque posee además, la capacidad de inhibir *in vitro*  
y/o *in vivo*, la actividad biológica de TGF- $\beta$ 1.  
15
3. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones  
1 o 2, seleccionado del grupo formado por los  
péptidos identificados por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID  
NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 11, SEQ  
20 ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO:  
33, SEQ ID NO: 34, y sus sales farmacéuticamente  
aceptables.
4. Uso de un péptido con una secuencia de aminoácidos  
25 seleccionada entre una cualquiera de las secuencias  
SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 22, y SEQ ID NO: 24 a SEQ  
ID NO: 36, o fragmentos de entre 3 y 15 aminoácidos  
de los mismos, y sus sales farmacéuticamente  
aceptables, en la elaboración de una composición  
30 farmacéutica con capacidad de inhibir la actividad  
biológica de TGF- $\beta$ 1.

5. Uso de un péptido según la reivindicación 4, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada de TGF- $\beta$ 1.
6. Uso de un péptido según la reivindicación 5, en el que dichas enfermedades o alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada de TGF- $\beta$ 1, comprenden la fibrosis asociada con la pérdida de función de un órgano o un tejido, y las complicaciones quirúrgicas y/o estéticas.
7. Uso de un péptido según una de las reivindicaciones 5 o 6, en el que dichas enfermedades o alteraciones patológicas, asociadas con una expresión en exceso o desregulada de TGF- $\beta$ 1, están seleccionadas entre fibrosis pulmonar, fibrosis hepática (cirrosis), fibrosis renal, fibrosis corneal, fibrosis asociada con la cirugía cutánea y peritoneal, fibrosis asociada con quemaduras, fibrosis osteo-articular o queloides.
8. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, que comprende al menos un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, junto con

uno o más, compuestos inhibidores de TGF- $\beta$ 1 diferentes de dichos péptidos.

10. Secuencia de ADN que codifica para un péptido según  
5 una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

11. Construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN según la reivindicación 10.

10 12. Construcción de ADN según la reivindicación 11 que comprende, además, operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión de dicha secuencia de ADN.

15 13. Vector que comprende una secuencia de ADN según la reivindicación 10, o una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12.

20 14. Célula hospedadora que comprende una secuencia de ADN según la reivindicación 10, o una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, o un vector según la reivindicación 13.

25 15. Procedimiento para producir un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende crecer una célula hospedadora según la reivindicación 14 bajo condiciones que permiten la producción de dicho péptido, y su recuperación.

30

16. Uso de una secuencia de ADN según la reivindicación 10, o de una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, para inhibir la actividad biológica de TGF- $\beta$ 1 mediante terapia génica.

17. Uso de una secuencia de ADN según la reivindicación 10, o de una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en la elaboración de vectores y células para el tratamiento de enfermedades y alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1 mediante terapia génica.



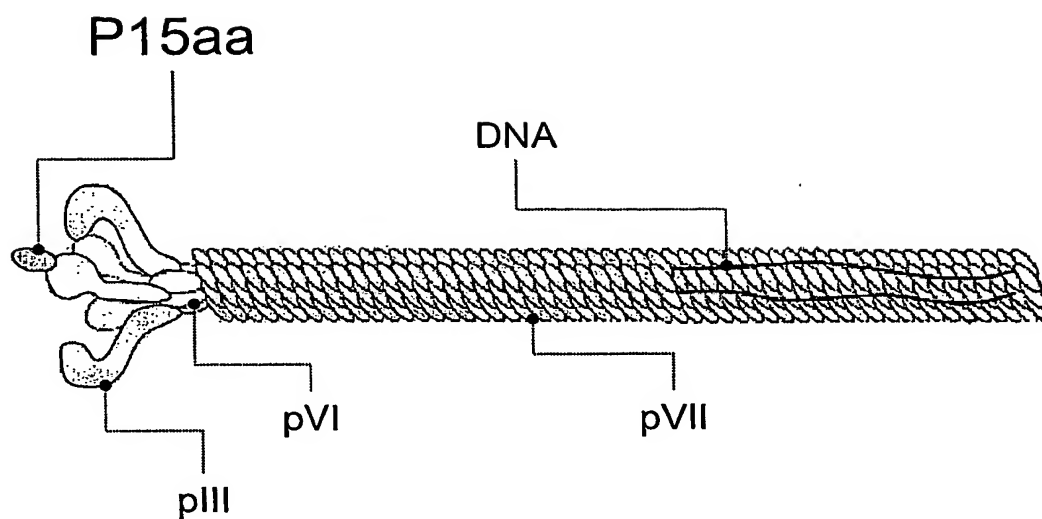
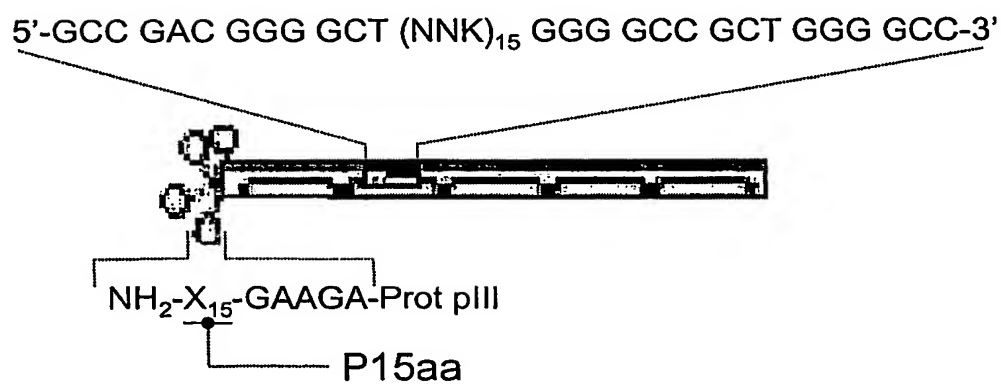
**DECLARACIÓN SEGÚN EL ARTÍCULO 19(1)**

**Solicitud de patente internacional PCT/ES04/000320**

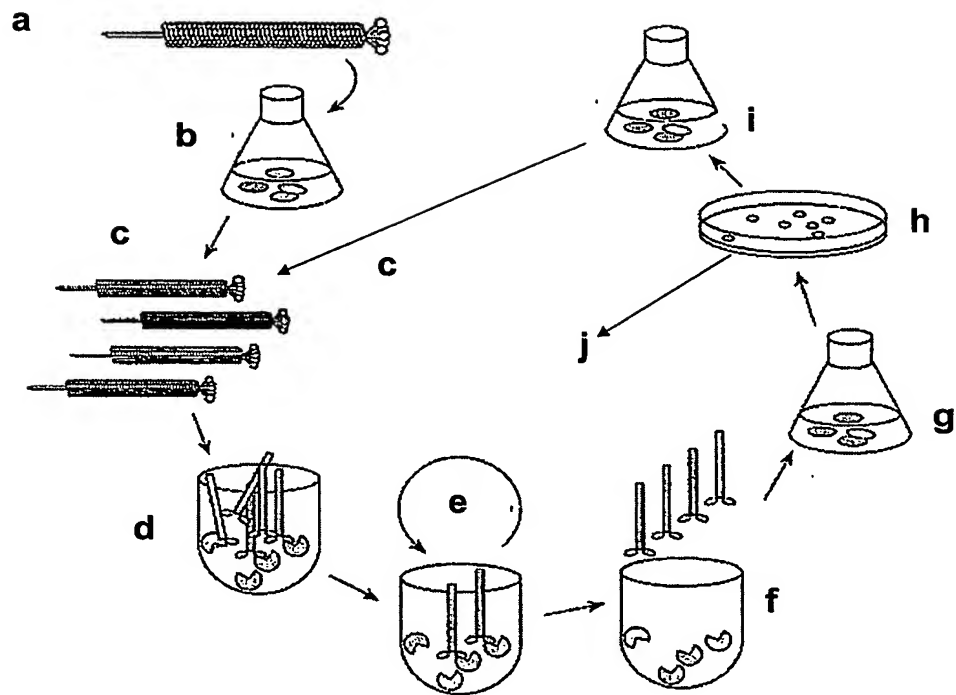
**Solicitante: FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN MÉDICA APLICADA**

1. La reivindicación 1 modificada mediante la fusión con la característica de la reivindicación 3.
2. La reivindicación 2 se ha eliminado por ser redundante.
3. La reivindicación 3 se ha eliminado por estar incluida dentro de la 1, y por lo tanto se ha eliminado la reivindicación 4 porque pasa a ser redundante.
4. Las reivindicaciones 2 y 3 actuales corresponden a las reivindicaciones 5 y 6 anteriores.
5. La reivindicación 4 posee soporte en la descripción de la invención, concretamente en la página 11 línea 29 a página 12 línea 7.
6. Las reivindicaciones 5 a 7 corresponden a las reivindicaciones 9 a 11 originales.
7. Las reivindicaciones 8 y 9 corresponden a las reivindicaciones 7 y 8 originales.
8. Las reivindicaciones 10 a 15 corresponden a las reivindicaciones 12 a 17 originales.
9. La reivindicación 16, puesto que se basa en la reivindicación 4, posee el mismo soporte en la descripción de la invención, es decir, en la página 11 línea 29 hasta la página 12 línea 7.
10. La reivindicación 17 corresponde a la reivindicación 18 original.

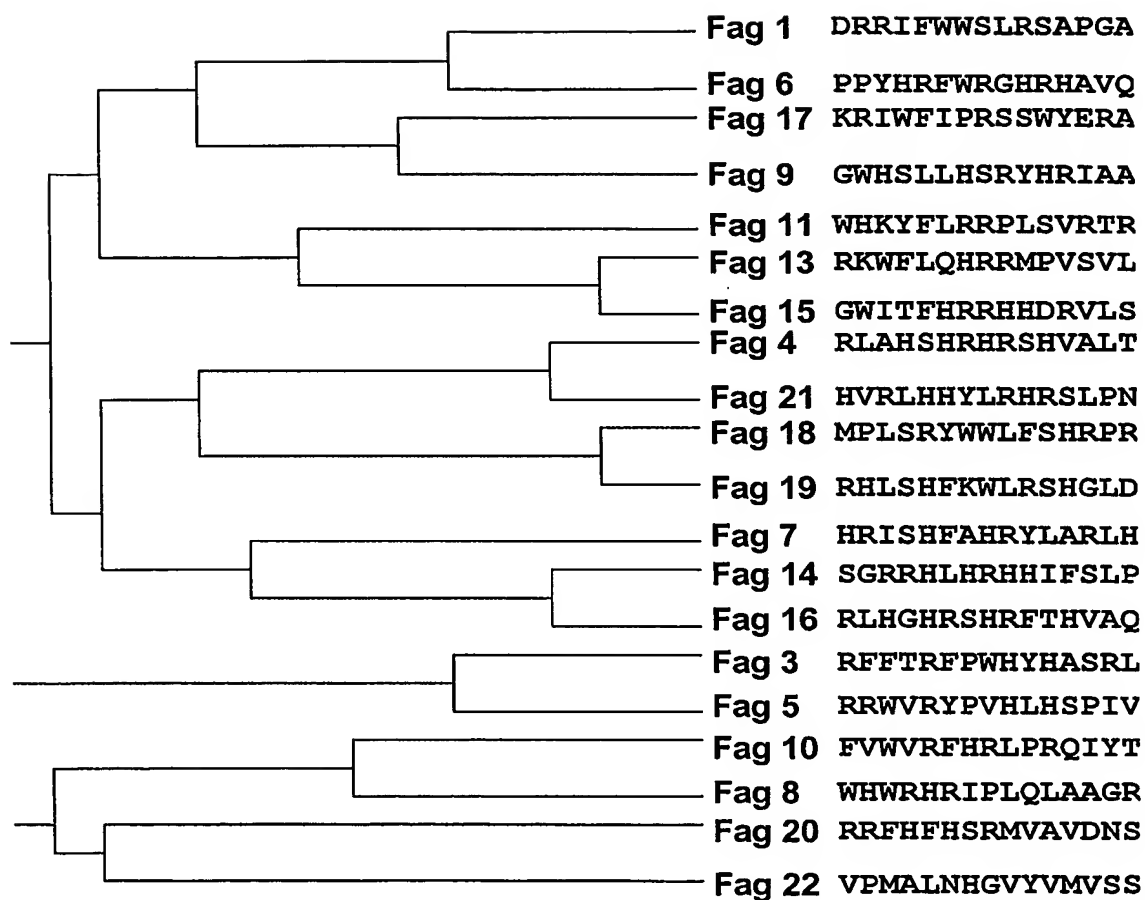
1 / 5

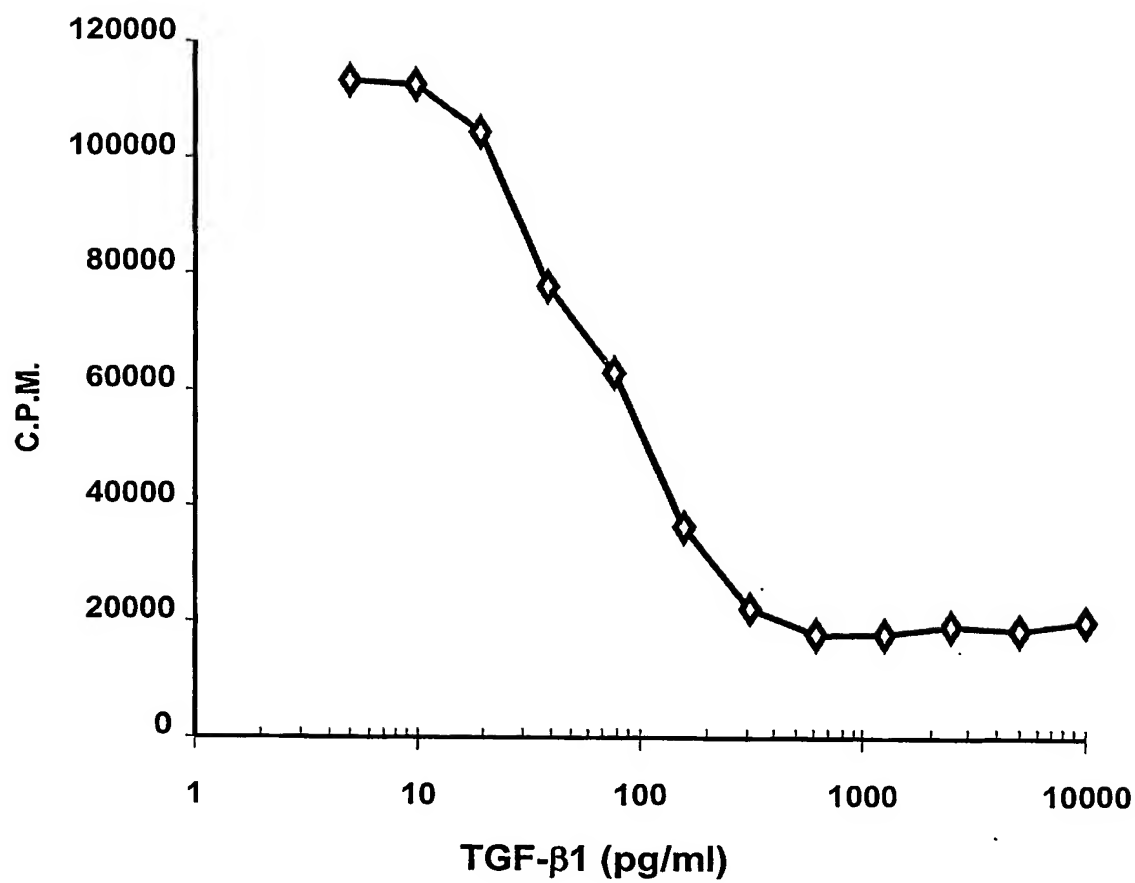
**Figura 1****Figura 2**

2 / 5

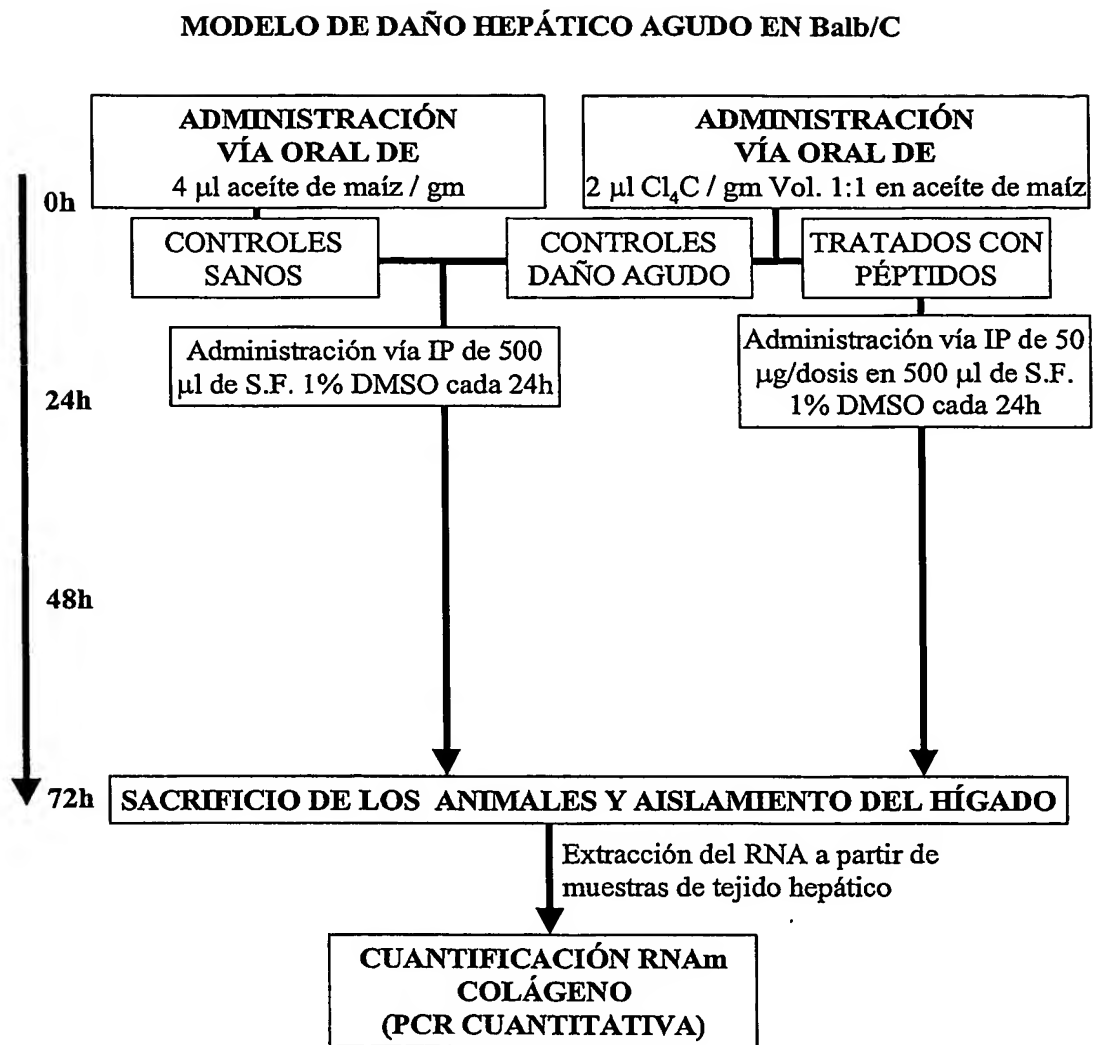
**Figura 3**

3 / 5

**Figura 4**

**Figura 5**

5 / 5

**Figura 6**

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN MÉDICA APLICADA  
(FIMA)

<120> PÉPTIDOS CON CAPACIDAD DE UNIRSE AL FACTOR  
TRANSFORMANTE DEL CRECIMIENTO beta1 (TGF-beta1)

<130> FIMA02007

<150> ES 200302020

<151> 2003-08-22

<160> 36

<170> PatentIn version 3.1

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 1

Asp	Arg	Arg	Ile	Phe	Trp	Trp	Ser	Leu	Arg	Ser	Ala	Pro	Gly	Ala
1				5				10						15

<210> SEQ ID NO: 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 2

Asp	Arg	Arg	Ile	Phe	Trp	Trp	Ser	Asn	Arg	Ser	Ala	Pro	Gly	Ala
1				5				10						15

<210> SEQ ID NO: 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 3

Arg	Phe	Phe	Thr	Arg	Phe	Pro	Trp	His	Tyr	His	Ala	Ser	Arg	Leu
1				5				10						15

## 2

<210> SEQ ID NO: 4  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial

<400> 4  
Arg Leu Ala His Ser His Arg His Arg Ser His Val Ala Leu Thr  
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 5  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial

<400> 5  
Arg Arg Trp Val Arg Tyr Pro Val His Leu His Ser Pro Ile Val  
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 6  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial

<400> 6  
Pro Pro Tyr His Arg Phe Trp Arg Gly His Arg His Ala Val Gln  
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 7  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial

<400> 7  
His Arg Ile Ser His Phe Ala His Arg Tyr Leu Ala Arg Leu His  
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 8  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial

<400> 8  
Trp His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly Arg  
1 5 10 15



<210> SEQ ID NO: 9  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial

<400> 9  
Gly Trp His Ser Leu Leu His Ser Arg Tyr His Arg Ile Ala Ala  
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 10  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial

<400> 10  
Phe Val Trp Val Arg Phe His Arg Leu Pro Arg Gln Ile Tyr Thr  
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 11  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial

<400> 11  
Trp His Lys Tyr Phe Leu Arg Arg Pro Leu Ser Val Arg Thr Arg  
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 12  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial

<400> 12  
Trp His Lys Tyr Phe Leu Arg Arg Pro Leu Ser Val Gly Leu Gly  
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 13  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial

<400> 13

4

Arg Lys Trp Phe Leu Gln His Arg Arg Met Pro Val Ser Val Leu  
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 14

Ser Gly Arg Arg His Leu His Arg His His Ile Phe Ser Leu Pro  
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 15

Gly Trp Ile Thr Phe His Arg Arg His His Asp Arg Val Leu Ser  
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 16

Arg Leu His Gly His Arg Ser His Arg Phe Thr His Val Ala Gln  
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 17

Lys Arg Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu Arg Ala  
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 18

<211> 15

<212> PRT

## 5

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 18

Met	Pro	Leu	Ser	Arg	Tyr	Trp	Trp	Leu	Phe	Ser	His	Arg	Pro	Arg
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 19

Arg	His	Leu	Ser	His	Phe	Lys	Trp	Leu	Arg	Ser	His	Gly	Leu	Asp
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 20

Arg	Arg	Phe	His	Phe	His	Ser	Arg	Met	Val	Ala	Val	Asp	Asn	Ser
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 21

His	Val	Arg	Leu	His	His	Tyr	Leu	Arg	His	Arg	Ser	Leu	Pro	Asn
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 22

Val	Pro	Met	Ala	Leu	Asn	His	Gly	Val	Tyr	Val	Met	Val	Ser	Ser
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 23  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
<223> Oligonucleótido iniciador fdtet15-mer

<400> 23  
TGAATTTTCT GTATGAGG 18

<210> SEQ ID NO: 24  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial obtenido por truncado  
del péptido SEQ ID NO: 17  
<400> 24

Arg Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu Arg Ala  
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 25  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial obtenido por truncado  
del péptido SEQ ID NO: 17

<400> 25  
Arg Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu Arg  
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 26  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial obtenido por truncado  
del péptido SEQ ID NO: 17

<400> 26  
Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu Arg Ala  
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 27  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial obtenido por truncado  
del péptido SEQ ID NO: 17  
<400> 27  
Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu  
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial obtenido por truncado  
del péptido SEQ ID NO: 17

<400> 28  
Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr  
1 5

<210> SEQ ID NO: 29  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial obtenido por truncado  
del péptido SEQ ID NO: 17

<400> 29  
Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu Arg Ala  
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 30  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial obtenido por truncado  
del péptido SEQ ID NO: 17

<400> 30  
Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu Arg Ala  
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 31  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial obtenido por truncado  
del péptido SEQ ID NO: 17

<400> 31  
Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu Arg Ala  
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 32  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial obtenido por truncado  
del péptido SEQ ID NO: 17

<400> 32  
Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu Arg Ala  
1 5

<210> SEQ ID NO: 33  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial obtenido por truncado  
del péptido SEQ ID NO: 17

<400> 33  
Lys Arg Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu Arg  
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 34  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Péptido secuencia artificial obtenido por truncado  
del péptido SEQ ID NO: 17

<400> 34  
Lys Arg Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr  
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial obtenido por truncado  
del péptido SEQ ID NO: 17

<400> 35

Lys	Arg	Ile	Trp	Phe	Ile	Pro	Arg	Ser	Ser
1				5					10

<210> SEQ ID NO: 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial obtenido por truncado  
del péptido SEQ ID NO: 17

<400> 36

Lys	Arg	Ile	Trp	Phe	Ile	Pro	Arg	Ser
1				5				

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/000320

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**IPC 7 C07K 7/06, 7/08, A61K 38/08,38/10, C12N 15/11, A61P 1/16, 43/00**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**IPC 7 C07K, A61K, C12N, A61P**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**CIBEPAT, EPODOC, REG, HCAPLUS**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p><b>JP 8151396 A (TEIJIN, LTD), 11.06.1996, SEQ ID n° 66.</b></p> <p><b>WO 0024782 A (AMGEN INC.), 04.05.2000, page 425, SEQ ID n° 1099.</b></p> <p><b>ISHIKAWA, D. et al. "GD1<math>\alpha</math>-replica peptides functionally mimic GD1<math>\alpha</math>, an adhesion molecule of metastatic tumor cells, and suppress the tumor metastasis". FEBS LETTERS, 1998, Vol. 441, pages 20-24, The whole document, in particular Table 1 peptide 3.</b></p> <p><b>ES 2146552 A (INSTITUTO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DE NAVARRA, S.A.), 01.08.2000.</b></p>	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**27 SEP 2004 (27.09.04)**

Date of mailing of the international search report

**08 OCT 2004 (08.10.04)**

Name and mailing address of the ISA/

**S.P.T.O.**

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ ES 2004/000320

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

☒ Claims Nos.: **1-3**

**The subject matter of the invention is not clearly defined and the precise technical features of the hypothetical sequence peptides comprising between 3 and 15 amino acids are not supported. The search was restricted to the sequences specified in the list of the sequences representing the peptides obtained in the examples.**

**PCT Rule 6.3(ii)**

**Box III**

**Invention 1. -peptides of SEQ ID NOs: 1-16, 18-22 with the ability to bond to TGF- $\beta$ 1.**

**Invention 2. -peptides of SEQ ID NOs: 17 and 24 to 36 with the ability to bond to TGF- $\beta$ 1.**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2004/000320

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP8151396 A	11.06.1996	NONE	-----
WO 0024782 A	04.05.2000	CA 2347131 A AU 1232200 A NO 20011963 A EP 1144454 A EP 19990971003 CN 1331701 T ZA 200102753 A BR 9914708 A SK 5252001 A HU 0203506 A JP 2003512011 T BG 105461 A AU 767725 B US 6660843 B NZ 510888 A US 2004044188 A US 2004053845 A US 2004057953 A US 2004071712 A US 2004077022 A US 2004087778 A	04.05.2000 15.05.2000 21.06.2001 17.10.2001 25.10.1999 16.01.2002 11.06.2002 16.07.2002 03.12.2002 28.02.2003 02.04.2003 30.04.2003 20.11.2003 09.12.2003 30.01.2004 04.03.2004 18.03.2004 25.03.2004 15.04.2004 22.04.2004 06.05.2004
ES 2146552 AB	01.08.2000	CA 2352537 A WO 0031135 A AU 1507700 A BR 9915604 A EP 1132403 A EP 19990957342 CN 1328569 T JP 2002530431 T AU 767498 B	02.06.2000 02.06.2000 13.06.2000 07.08.2001 12.09.2001 23.11.1999 26.12.2001 17.09.2002 13.11.2003

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/ ES 2004/000320

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> C07K 7/06, 7/08, A61K 38/08,38/10, C12N 15/11, A61P 1/16, 43/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP<sup>7</sup> C07K, A61K, C12N, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, REG, HCAPLUS

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	JP 8151396 A (TEIJIN, LTD), 11.06.1996, SEQ ID n° 66.	1-8, 12-17
X	WO 0024782 A (AMGEN INC.), 04.05.2000, página 425, SEQ ID n° 1099.	1-8, 12-17
X	ISHIKAWA, D. et al. "GD1 $\alpha$ -replica peptides functionally mimic GD1 $\alpha$ , an adhesion molecule of metastatic tumor cells, and suppress the tumor metastasis". FEBS LETTERS, 1998, Vol. 441, páginas 20-24, todo el documento, especialmente Tabla 1, péptido 3.	1-8, 12-17
A	ES 2146552 A (INSTITUTO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DE NAVARRA, S.A.), 01.08.2000.	1-18

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

27.Septiembre.2004 (27.09.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

08 OCT 2004 08.10.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Nº de teléfono + 34 91 3495552

## INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/000320

### Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°:  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones n°: 1-3  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:  
No está claramente definido el objeto de la invención y no se aportan las características técnicas exactas de los hipotéticos péptidos de secuencias comprendidas entre 3 y 15 aminoácidos. La búsqueda se ha limitado a las secuencias aportadas en la lista de secuencias que representan a los péptidos obtenidos en los ejemplos. Regla 6.3.ii PCT.
3. ☐ Las reivindicaciones n°:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

### Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:  
Invención 1.- Péptidos de SEQ ID n° 1-16, 18-22 con capacidad de unirse a TGF- $\beta$ 1.  
Invención 2.- Péptidos de SEQ ID n° 17, 24-36 con capacidad de unirse a TGF- $\beta$ 1

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°:

Indicación en cuanto a la protesta ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una protesta por parte del solicitante.  
☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

**INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/000320

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
JP8151396 A	11.06.1996	NINGUNO	-----
WO 0024782 A	04.05.2000	CA 2347131 A AU 1232200 A NO 20011963 A EP 1144454 A EP 19990971003 CN 1331701 T ZA 200102753 A BR 9914708 A SK 5252001 A HU 0203506 A JP 2003512011 T BG 105461 A AU 767725 B US 6660843 B NZ 510888 A US 2004044188 A US 2004053845 A US 2004057953 A US 2004071712 A US 2004077022 A US 2004087778 A	04.05.2000 15.05.2000 21.06.2001 17.10.2001 25.10.1999 16.01.2002 11.06.2002 16.07.2002 03.12.2002 28.02.2003 02.04.2003 30.04.2003 20.11.2003 09.12.2003 30.01.2004 04.03.2004 18.03.2004 25.03.2004 15.04.2004 22.04.2004 06.05.2004
ES 2146552 AB	01.08.2000	CA 2352537 A WO 0031135 A AU 1507700 A BR 9915604 A EP 1132403 A EP 19990957342 CN 1328569 T JP 2002530431 T AU 767498 B	02.06.2000 02.06.2000 13.06.2000 07.08.2001 12.09.2001 23.11.1999 26.12.2001 17.09.2002 13.11.2003